1908

Zur Kenntniss

der

Fermente des Nucleinstoffwechsels.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

hohen medicinischen Fakultät

der

k. b. Friedrich-Alexanders-Universität Erlangen

vorgelegt von

Werner Künzel

aus Leipzig.

Berlin 1908.

Druck von L. Schumacher.

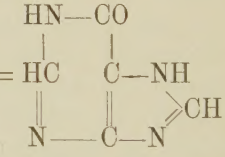
Tag der mündlichen Prüfung: 31. Juli 1908.

Die physiologisch-chemischen Forschungen über die Herkunft der Harnsäure im Säugethierorganismus waren lange Zeit insofern irrige, als sie Harnsäure analog dem Harnstoff für ein Endproduct des Eiweissstoffwechsels ansahen. Wenn auch diese Auffassung niemals strikte bewiesen war, so hatte sie sich doch so sehr festgesetzt, dass sie noch lange nachdem die eigentliche Quelle in den Purinbasen gefunden war immer noch in zahlreichen Arbeiten und Lehrbüchern sich vorfand. Durch eine grössere Reihe von Arbeiten der neuesten Zeit ist es nunmehr sicher bewiesen, dass ein scharfer Unterschied besteht zwischen der Herkunft der Harnsäure im Säugethier- und Vogelorganismus. Während für den Vogelorganismus zutrifft, dass die Harnsäure als Endproduct in eine Reihe mit dem Harnstoff der Säugethiere zu setzen ist und ihre Quelle sowohl aus dem Eiweiss, wie aus den Purinkörpern schöpft, steht es jetzt für den Säugethierorganismus absolut fest, dass die Harnsäure einzig und allein aus den Purinbasen entsteht. Die Harnsäure ist also das specielle Endproduct einer Reihe von Körpern, welche mit dem Eiweissmolekül und den dasselbe zusammensetzenden Aminosäuren absolut nichts zu thun haben, sondern Bestandtheile einer ganz scharf charakterisirten Verbindung ist, der Nucleinsäure, deren Vorkommen sich auf die Zellkerne beschränkt. Wir müssen also die Harnsäure als Endproduct des sogenannten Nucleinstoffwechsels ansehen. Es ist möglich, dass eine gewisse Menge der Harnsäure im Säugethierorganismus auch aus Purinkörpern (Hypoxanthin) entsteht, welche in freiem, nicht wie in der Nucleinsäure in gebundenem Zustand vorkommen und zwar in der Muskelsubstanz. Nach den Untersuchungen von Burian (1) am isolirten Säugethiermuskel tritt bei der Arbeit eine Vermehrung des Hypoxanthingehalts in demselben ein, welche zu einer gesteigerten Harnsäurebildung führt. Die Herkunft dieses Hypoxanthins ist noch nicht ganz sicher. Es ist möglich, dass dasselbe ebenfalls aus den Nucleinen der Muskelkerne entsteht und aus der Inosinsäure, von der ja mit grösster Wahrscheinlichkeit anzunehmen ist, dass sie in engster Beziehung zu den Nucleinsäuren steht. Es könnte aber dieses Hypoxanthin auch auf irgend einem noch unbekannten Wege aus anderen Substanzen entstanden sein. Jedenfalls ist aber auch für diese Muskelharnsäure die Vorstufe eine Purinbase. Es ist von Wiener (2) angenommen worden, dass auch eine synthetische Bildung von Harnsäure im Säugethierorganismus statthat, indem er vermeinte, durch Zusatz von Tartron- und Dialursäure zu purinbasenhaltigen Rinderleberauszügen unter gewissen Bedingungen eine

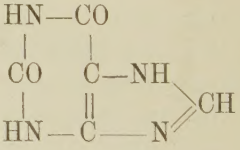
Entstehung von Harnsäure aus diesen Säuren nachgewiesen zu haben. Durch Burian (3) ist es aber nachgewiesen worden, dass eine solche synthetische Bildung in der That nicht stattfindet, eine Beobachtung, welche sich wesentlich mit den Resultaten der späteren Harnsäureforschung deckt.

Es sind vor allem die Versuche von Schittenhelm, welche den Ablauf der Harnsäurebildung in den Organen der Säugethiere klarstellen, indem derselbe die einzelnen Fermente und die einzelnen Stufen der Fermentreactionen zu trennen vermochte. Zu dem Verständniss dieser Untersuchung muss man sich der chemischen Beziehung zwischen Harnsäure und Purinbasen, wie sie durch die berühmten Synthesen Emil Fischer's (4) aufgedeckt wurden, erinnern, sowie der Stellung der Purinbasen in den Nucleinen, deren Kenntniss wir vor allem A. Kossel (5) verdanken. Was die chemischen Beziehungen anbelangt, so ersieht man dieselben am einfachsten aus den Constitutionsformeln.

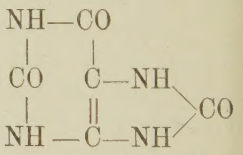
Hypoxanthin ($C_5H_4N_4O$) = 6. Oxypurin =



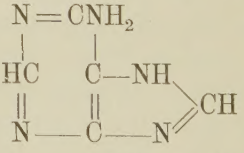
Xanthin ($C_5H_4N_4O_2$) = 2. 6. Dioxypurin =



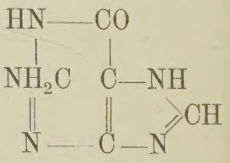
Harnsäure ($C_5H_4N_4O_3$) = 2. 6. 8. Trioxysäure =



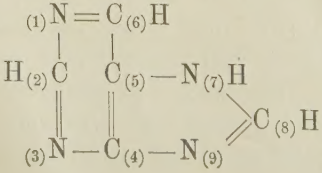
Adenin ($C_5H_5N_5$) = 6. Aminopurin =



Guanin ($C_5H_5N_5O$) = 2. Amino, 6. Oxypurin =

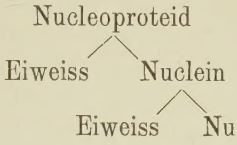


Allen diesen Körpern gemeinsam ist der sogenannte Purinkern und die einfachste Verbindung der ganzen Gruppe die Wasserstoffverbindung, das Purin.



Denkt man sich in das Purin Sauerstoffatome eingetreten, so hat man damit die Bildung von Hypoxanthin, Xanthin und Harnsäure. Denkt man sich ein Wasserstoff durch das Amid NH_2 ersetzt, so entsteht Adenin, tritt hierzu noch ein Sauerstoff, so erscheint das Guanin.

Im Organismus finden wir die Purinbasen in der Nucleinsäure an Phosphorsäure gebunden, welche ihrerseits wieder sich zu Nucleinen und und Nucleoproteiden paart. Bei der Spaltung der Nucleoproteide werden die gepaarten Eiweissreste stufenweise entfernt und es bleibt die Nucleinsäure. Das folgende Schema illustrirt die Verhältnisse.



Bei der Ausspaltung der Nucleinsäure endlich findet man als deren Bestandtheile Phosphorsäure, Purinbasen (vornehmlich Adenin und Guanin), Pyrimidinbasen (Thymin, Uracil und Cytosin) und eine Kohlenhydratgruppe (Pentose und Hexose).

Auf diese Erkenntnisse fussend hat Schittenhelm (6) im Anschluss an Untersuchungen von Horbaczewski (7) und Spitzer (8) systematisch Versuche über die Einwirkung der verschiedensten Organe diverser Säugethiere unter Zugabe von Purinkörpern angestellt und durch verschiedene Versuchsanordnungen die einzelnen Etappen studirt. Dabei hat sich herausgestellt, dass zunächst durch die Einwirkung einer Nuclease die Purinbasen aus dem Nucleinsäuremolekül abgespalten und in Freiheit gesetzt werden. Auf das nunmehr freie Adenin und Guanin wirkt ein desamidirendes Ferment, die Purindesamidase ein; dabei wird die Amidogruppe entfernt. Sofort setzt dann ein oxydirendes Ferment, die Xanthinoxydase ein, welche die Oxydation der niederen Oxypurine (Hypoxanthin und Xanthin) zu Harnsäure durchführt. Nunmehr tritt ein Ferment in Thätigkeit, welches auf die gebildete Harnsäure einwirkt. Dieses uricolytische Ferment zersetzt die Harnsäure. Als Zersetzungsproduct findet sich beim Rinde Allantoin.

In jüngster Zeit ist die Harnsäurebildung als Ausdruck einer Thätigkeit specieller Organfermente von Cohnheim (9) angezweifelt worden, indem derselbe geltend machte, dass bei der Versuchsanordnung in Folge der längeren Dauer (2 Tage) eine Harnsäurebildung durch Bakterien nicht ausgeschlossen sei. Schittenhelm (10) hat diesen Einwurf energisch zurückgewiesen und durch Versuche gezeigt, dass einmal Bakterien gar nicht im Stande sind, aus Purinkörpern Harnsäure zu bilden, und dass an eine Einwirkung von Bakterien gar nicht zu denken ist. Es wird nämlich aus zu Organextract (Rindermilz) zugesetzten Aminopurinen (Guanin, Adenin) schon nach 15—20 Minuten nachweisbare Harnsäure und der Process ist nach einer Stunde quantitativ beendet.

Auch gegen die Uricolyse als Fermentwirkung sind Bedenken laut geworden, indem behauptet wurde, dass die Zerstörung der Harnsäure nicht durch die Fermente, sondern durch die zu ihrer Lösung benutzten

schwachen Alkalien herbeigeführt worden seien. Auch dieser Einwurf wurde von Schittenhelm (11) bereits zurückgewiesen. Immerhin ist zur Vervollständigung des Beweises, dass es sich um eine Fermentwirkung handelt, eine Berücksichtigung des zeitlichen Ablaufes von grossem Interesse. Die folgenden Untersuchungen werden sich damit beschäftigen.

Bei den Untersuchungen über die zeitlichen Verhältnisse der Uricolyse sind wir so vorgegangen, dass wir einmal Harnsäure zu Nierenextract zugaben und von Stunde zu Stunde deren Verschwinden beobachteten. Sodann haben wir, um zu erkennen, wie sich das uricolytische Ferment der Harnsäure in statu nascendi gegenüber verhält, mit Guanin beschickten Milzextract, in welchem nachgewiesenermaassen eine sehr intensive und schnell ablaufende Bildung von Harnsäure vor sich geht, mit Nierenextract, der auf seine gut functionirende uricolytische Fähigkeit untersucht war, gemischt und in diesem Gemisch den Ablauf der Uricolyse zeitlich verfolgt. Dabei kamen wir auf eigenartige Beeinflussungen der Extracte untereinander, wodurch die Fermentreactionen zeitlich sehr wesentlich modificirt wurden. Wir werden nachher die Beschreibung unserer Versuche in 2 Abtheilungen theilen:

I. Zeitlicher Ablauf der Uricolyse.
II. Gegenseitige Beeinflussung der Fermente des Nucleinstoffwechsels.

I. Zeitlicher Ablauf der Uricolyse.

Bereits im Jahre 1860 hat Stockvis (12) in Amsterdam Harnsäurezersetzung durch Organbrei beobachtet. Später hat Brunton (13) in Gemeinschaft mit Bokenham die Versuche wieder aufgenommen und die Angaben von Stockvis bestätigt; er stellte fest, dass durch Erwärmen von harnsauren Salzen mit Brei von Verdauungsleber Harnsäure zersetzt und Harnstoff gebildet wird, während in Lebern von Thieren welche gefastet haben, angeblich Harnsäure nicht zersetzt wird. Dann hat Wiener (l. c.) festgestellt, dass der Niere, der Leber und dem Muskel des Rindes harnsäurezerstörende Fähigkeiten zukommen, Burian (l. c.) hat für die Leber und den Muskel, Ascoli (14) für die Leber des Rindes dieselbe Beobachtung gemacht. Schittenhelm (l. c.) hat festgestellt, dass ein uricolytisches Ferment in der Niere, der Leber, dem Muskel und vielleicht dem Knochenmark des Rindes zu finden ist, während die Milz die Lunge und der Darm wohl Harnsäure zu bilden, aber nicht zu zerstören vermögen. Schittenhelm hat dann weiter das uricolytische Ferment aus dem Nierenextract durch Anwendung der Rosell'schen Fällungsmethode zu isoliren vermocht. Die so gewonnenen Fermentlösungen zeigten eine sehr intensive Wirksamkeit. Dass es sich thatsächlich um ein Ferment handelte, und dass nicht etwa der alkalische Charakter der Lösung oder gar geringe Mengen in Lösung gebliebene Uratsalze das wirksame Princip darstellten, bewies er damit, dass er Versuche mit derselben Fermentlösung ansetzte, welche vorher bis zu einer halben Stunde auf 100° erwärmt worden war. Dabei zeigte sich, dass in dieser abgekochten Lösung bei analoger Versuchsanordnung die Harnsäure

zerstörung eine nur ganz minimale war. Endlich haben Wiechowski und Wiener(15) Versuche unternommen über Eigenschaften und Darstellung des harnsäurezerstörenden Ferments der Rinderniere und Hundeleber. Dieselben stellten fest, dass dasselbe eine nur bei schwach alkalischer oder neutraler Reaction wirkende Oxydase ist. Die jeweilige Grösse der Zersetzung ist nicht nur abhängig von der Fermentmenge und Wirkungszeit, sondern innerhalb gewisser Grenzen auch von der zur Verfügung stehenden Menge Harnsäure. Sie haben dann noch die Wirkung verschiedener physikalischer und chemischer Eingriffe auf das Ferment in Betracht gezogen. Die Forscher arbeiteten dabei stets mit Organpulvern, welche durch rasches, wenige Stunden währendes Trocknen der blutfreigespülten überlebenden Organe in dünnster Schicht bei 37°, Vermahlen mit Toluol in einer Farbenreibmaschine, Abnutschen und Farbstofffreiwaschen mit Toluol auf der Nutsche hergestellt waren. Diese Organpulver wurden dann mit schwacher (0,025 proc.) Sodalösung extrahirt und das Extract als Fermentlösung benutzt.

In der Erwägung, dass möglichst frischer Organextract doch wohl wirksamere Fermentlösung geben dürfte, wie eine Fermentlösung, welche durch derartig intensive Eingriffe auf das Organ hergestellt werden, benutzten wir zu unseren Versuchen keine isolirten Fermentlösungen, sondern frische Organextracte.

Dieselben wurden so hergestellt, dass wir frisch vom Schlachthof bezogene Rinderniere sofort mit der Fleischhackmaschine fein zermahlten, den so erhaltenen Brei mit zwei Theilen Wasser gut verrührten und unter Zusatz von etwas Toluol und etwas Chloroform mehr oder weniger lang stehen liessen. Dann wurde colirt, durch Watte und dann durch in Wasser aufgeschwemmtes, fein vertheiltes Filtrirpapier auf der Nutsche filtrirt. Von dem gewonnenen Filtrat versetzten wir jeweils 350 ccm mit 0,3 g Harnsäure, welche in möglichst wenig Normalnatronlauge gelöst war, an. Die Versuche gingen bei einer Temperatur von 37° wechselnde Zeit, wobei wir in altbewährter Weise einen kräftigen Luftstrom durchleiteten. Nach Abbruch des Versuchs wurde das Reactionsgemenge aufgekocht, mit Natronlauge bis zur stark alkalischen Reaction versetzt, die so erhaltene Lösung mit Essigsäure coagulirt und im Filtrat die Purinkörper mit der Kupfersulfat-Bisulfitmethode gefällt. Die erhaltenen Kupferoxydulverbindungen wurden auf dem Filter gesammelt und säurefrei gewaschen, dann in heissem Wasser suspendirt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das klare Filtrat wurde unter Zusatz von 10—15 ccm einer 10proc. Salzsäure auf ca. 10 ccm eingeengt. Die wiedergewonnene Harnsäure wurde nach Horbaczewski durch Lösen in concentrirter Schwefelsäure und Wiederausfällen durch Verdünnen aufs 4fache Volumen gereinigt.

Versuchsreihe A.

350 ccm Nierenextract, zu dessen Bereitung das mit Wasser angesetzte zerkleinerte Nierengewebe über Nacht gestanden hatte, plus 0,3 g Harnsäure in Normalnatronlauge gelöst bei 37° unter ständiger Luftdurchleitung unter Zusatz von Toluol und Chloroform,

Versuch I wurde nach $^1/_2$ Stunde unterbrochen.
Wiedererhalten 0,21 g Harnsäure, also zerstört 30 pCt.
Versuch II wurde nach 1 Stunde unterbrochen.
Wiedererhalten 0,16 g Harnsäure, also zerstört 47 pCt.
Versuch III wurde nach 2 Stunden unterbrochen.
Wiedererhalten 0,125 g Harnsäure, also zerstört 58 pCt.
Versuch IV wurde nach 4 Stunden unterbrochen.
Wiedererhalten 0,07 g Harnsäure, also zerstört 77 pCt.
Versuch V wurde nach 6 Stunden unterbrochen.
Wiedererhalten Spuren Harnsäure. Nahezu alle Harnsäure zerstört.

Versuchsreihe B.

Neuer, analog wie oben geschildert, gewonnener Nierenextract wurde ebenso angesetzt.
Versuch VI wurde nach 4 Stunden unterbrochen.
Wiedererhalten 0,07 g Harnsäure, also zerstört 77 pCt.
Versuch VII wurde nach 6 Stunden unterbrochen.
Wiedererhalten Spuren Harnsäure. Nahezu alle Harnsäure zerstört
Versuch VIII wurde nach 7 Stunden unterbrochen.
Wiedererhalten keine Harnsäure. Alle Harnsäure zerstört.
Versuch IX wurde nach 7 Stunden unterbrochen.
Wiedererhalten keine Harnsäure. Alle Harnsäure zerstört.

Versuchsreihe C.

Von der ganz frisch zerkleinerten und sofort angesetzten Niere wurde eine Hälfte bereits nach 3—4 Stunden colirt und filtrirt und sofort wie oben zur Luftdurchleitung angesetzt.
Versuch X wurde nach 2 Stunden unterbrochen.
Wiedererhalten 0,03 g Harnsäure, also zerstört 90 pCt.
Versuch XI wurde nach 4 Stunden unterbrochen.
Wiedererhalten keine Harnsäure. Alle Harnsäure zerstört.

Die zweite Hälfte desselben Extracts wurde nach 24 Stunden colir und filtrirt und ebenso angesetzt.
Versuch XII wurde nach 4 Stunden unterbrochen.
Wiedererhalten keine Harnsäure. Alle Harnsäure zerstört.
Versuch XIII wurde nach 7 Stunden unterbrochen.
Wiedererhalten keine Harnsäure. Alle Harnsäure zerstört.

Versuchsreihe D.

Ganz frisch gewonnener Extract wie in Versuch X und XI der Versuchsreihe C angesetzt.
Versuch XIV wurde nach 4 Stunden unterbrochen.
Wiedererhalten keine Harnsäure. Alle Harnsäure zerstört.

Versuchsreihe E.

Der Nierenextract wurde nach einem halben Tag wie oben verarbeite
Versuch XV wurde nach 4 Stunden unterbrochen.
Wiedererhalten 0,08 g Harnsäure, also zerstört 73 pCt.

Versuch XVI wurde nach 7 Stunden unterbrochen.
Wiedererhalten keine Harnsäure. Alle Harnsäure zerstört.

Versuchsreihe F. Einfluss der Verdünnung.

Frischer Nierenextract wurde nach dreistündigem Stehen wie oben verarbeitet.

Versuch XVII, 100 ccm Nierenextract wurden auf 350 ccm mit destillirtem Wasser aufgefüllt und wie oben verarbeitet.
Der Versuch wurde nach 4 Stunden unterbrochen.
Wiedererhalten 0,13 g Harnsäure, also zerstört 57 pCt.
Versuch XVIII, 350 ccm desselben Nierenextracts wie oben verarbeitet.
Der Versuch wurde nach 4 Stunden unterbrochen.
Wiedererhalten 0,02 g Harnsäure, also zerstört 93 pCt.

Versuchsreihe G. Einfluss von Säure.

Versuch XIX, 350 ccm Nierenextract mit 0,3 g Harnsäure in 5 ccm Normalnatronlauge gelöst plus 10 ccm Normalschwefelsäure.
Versuch wurde nach 4 Stunden unterbrochen.
Wiedererhalten 0,22 g Harnsäure, also zerstört 27 pCt.

Aus den Versuchen geht klar hervor, dass die Harnsäurezerstörung in den Nierenextracten einen sehr rasch ablaufenden Process darstellt, indem nach 7 Stunden, häufig auch, insbesondere bei Verarbeitung ganz frischen Nierenextracts schon nach 4 Stunden keine Spur der zugegebenen Harnsäure mehr nachzuweisen war. Offenbar hat längeres Stehen des Nierenextracts einen leicht abschwächenden Einfluss auf die Intensität der Uricolyse, sodass dieselbe zwar noch quantitativ zu Ende geführt wird, aber längere Zeit dazu benöthigt.

Ferner geht aus der Versuchsreihe F hervor, dass die Fermentmenge von wesentlichem Einfluss auf die Schnelligkeit der Fermentreaction ist, indem dieselbe um so geringer ist, je weniger Ferment angewandt wird.

Endlich zeigt uns Versuchsreihe G, dass die Harnsäurezerstörung bei saurer Reaction überaus gehemmt ist. Ob diese Hemmung auf directer Schädigung des Ferments durch die saure Reaction beruht, oder auf schlechterer Angreifbarkeit der vielleicht ausgefällten Harnsäure, lässt sich aus dem einen Versuch nicht klar ersehen. Jedenfalls stimmt die Beobachtung aber mit den Angaben von Wiechowski und Wiener über die Einwirkung der Säure überein.

II. Gegenseitige Beeinflussung der Fermente des Nucleinstoffwechsels.

Wie schon oben ausggeführt, wollen wir nunmehr den Einfluss des uricolytischen Ferments auf Harnsäure in statu nascendi prüfen.

Wir wählten also die Versuchsanordnung so, dass wir eine gut harnsäurebildende Fermentlösung mit der harnsäurezerstörenden vermischten.

Aus früheren Versuchen Schittenhelm's war bekannt, dass zum Studium der Harnsäurebildung aus Purinbasen sich am besten Extracte der Rindermilz eigneten, in welchen auch bequem die zwei Etappen der Harnsäurebildung zu verfolgen sind, die Desamidirung und die Oxydation. Die Versuche sind mit Guanin angestellt. Die Umsetzung des Guanins in Harnsäure nimmt folgenden Weg: Guanin—Xanthin—Harnsäure.

Lässt man durch einen mit Guanin beschickten Milzextract bei 37° einen starken Luftstrom hindurch, so ist, wenn man die Reaction schon nach 10—15 Minuten unterbricht, kein Guanin mehr nachweisbar, dafür aber Xanthin und Harnsäure. Xanthin erhält man ferner leicht, indem man die Reaction bei Brutschranktemperatur ohne Luftdurchleitung vorsichgehen lässt. Lässt man bei Luftdurchleitung den Versuch eine Stunde und länger gehen, so findet man danach sämmtliches Guanin bereits quantitativ in Harnsäure umgesetzt.

Auf dieser Erfahrung fussend, haben wir mit Guanin beschickten Milzextract zu gleichen Theilen mit Nierenextract gemischt und erwarteten nun, dass die durch den Milzextract aus dem Guanin bei Luftdurchleitung sich bildende Harnsäure sehr schnell von dem uricolytischen Ferment des Nierenextracts zerstört werde. Das war aber nicht der Fall. Vielmehr stellten sich die Verhältnisse bedeutend modificirt dar.

Die Darstellung des Nierenextracts geschah wie im ersten Theil und zwar benutzten wir zu den Versuchen stets einen Nierenextract, dessen tadellose uricolytische Fähigkeit in den oben mitgetheilten Versuchen zu gleicher Zeit sicher festgestellt wurde.

Den Milzextract stellten wir uns in analoger Weise her, nachdem wir die Milzpulpa aus ihrer Kapsel herauspräparirt hatten. Auch hier wurde ein Theil Organ und zwei Theile Wasser genommen. Es kann sofort bemerkt werden, dass der Milzextract beim Aufbewahren viel langsamer an Wirksamkeit verliert, wie der Nierenextract.

Die Isolirung der Purinkörper nach Abbruch des Versuchs geschah durch Fällung im enteiweissten Extract durch Kupfersulfat-Bisulfit. Die Kupferoxydulverbindungen wurden mit Schwefelwasserstoff zerlegt und salzsauer eingeengt. Der nach mehrstündigem Stehen abgeschiedene Niederschlag wurde abfiltrirt und nach Horbaczewski umgefällt. Dabei erhält man die Harnsäure, welche auf dem Filter gesammelt und gewogen wurde. Die Filtrate, das salzsaure und das schwefelsaure, wurden vereinigt, mit Natronlauge alkalisch gemacht, mit Essigsäure angesäuert und nun nochmals mit der Kupfermethode gefällt. Das Filtrat der Schwefelwasserstoffzersetzung wurde eingedampft, der Rückstand mit verdünntem Ammoniak gelöst. Dabei geht das Xanthin in Lösung während etwa vorhandenes Guanin ungelöst bleibt. Es kann hier sofort bemerkt werden, dass, abgesehen von einem Versuch, wo Nierenextract mit Guanin angesetzt war, nie Guanin wiedergefunden wurde. Das in Ammoniak gelöste Xanthin wird durch Einengung von Ammoniak befreit und dann weiter auf 3—5 ccm eingeengt. Das so erhaltene Xanthin wurde dann abfiltrirt, mit Alkohol und Aether gewaschen und gewogen

Versuchsreihe A.

175 ccm Milzextract plus 0,3 g in wenig Normalnatronlauge gelöstes Guanin plus 175 ccm Nierenextract unter Zusatz von Chloroform und Toluol bei 37° und beständigem Durchleiten eines starken Luftstroms.

Versuch I wurde nach $^1/_2$ Stunde unterbrochen.

Wiedergefunden: 0,1 g Harnsäure,
0,14 g Xanthin.

Es sind demnach von dem zugesetzten Guanin 47 pCt. als Xanthin wiedergefunden worden, ca. 50 pCt. in Harnsäure umgesetzt und davon nur 20 pCt. zerstört.

Versuch II wurde nach 1 Stunde unterbrochen.

Wiedergefunden: 0,1 g Harnsäure,
0,11 g Xanthin.

Es sind demnach von dem zugesetzten Guanin 37 pCt. als Xanthin wiedergefunden worden, ca. 60 pCt. in Harnsäure umgesetzt und davon 30 pCt. zerstört.

Versuch III wurde nach 2 Stunden unterbrochen.

Wiedergefunden: 0,18 g Harnsäure,
0,04 g Xanthin.

Es sind demnach von dem zugesetzten Guanin 13 pCt. als Xanthin wiedergefunden worden, ca. 87 pCt. in Harnsäure umgesetzt und davon 33 pCt. zerstört.

Versuchsreihe B.

Die Extracte wurden ebenso angesetzt wie in Versuchsreihe A.

Versuch IV wurde nach 4 Stunden unterbrochen.

Wiedergefunden: 0,15 g Harnsäure,
0,04 g Xanthin.

Es waren demnach von dem zugesetzten Guanin 13 pCt. als Xanthin wiedergefunden worden, ca. 87 pCt. in Harnsäure umgesetzt, aber davon nur 42 pCt. zerstört.

Versuch V wurde nach 7 Stunden unterbrochen.

Wiedergefunden: 0,17 g Harnsäure,
Spuren Xanthin.

Es wurde also nahezu alles Guanin in Harnsäure umgesetzt, von der umgesetzten Harnsäure aber nur 49 pCt. zerstört.

Versuchsreihe C.

350 ccm Milzextract plus 0,24 g Guanin plus 350 ccm Nierenextract werden ebenso angesetzt wie in Versuchsreihe A.

Versuch VI wurde nach 4 Stunden unterbrochen.

Wiedergefunden: 0,15 g Harnsäure,
0,16 g Xanthin.

Es sind demnach von dem zugesetzten Guanin 66 pCt. als Xanthin wiedergefunden worden, ca. 45 pCt. in Harnsäure umgesetzt.

Es ergeben sich darnach mehr Harnsäure und Xanthin zusammen, als dem zugesetzten Guanin entspräche. Das kommt davon her, dass

sowohl in dem Milz- wie in dem Nierenextract Purinkörper von vornherein enthalten waren, welche ebenfalls mitbestimmt wurden. Jedenfalls ist in diesem Versuch die Harnsäurezersetzung eine ganz minimale, resp. garnicht vorhanden, und der Versuch beweist zugleich, dass die Resultate der übrigen Versuche eher zu niedrig, wie zu hoch berechnet sind. Noch deutlicher treten diese Verhältnisse in der nächsten Versuchsreihe zu Tage.

Versuchsreihe D.

350 ccm Milzextract plus 0,3 g Guanin plus 350 ccm Nierenextract.

Versuch VII wurde nach 4 Stunden unterbrochen.

Wiedergefunden: 0,21 g Harnsäure,
0,17 g Xanthin.

Es sind demnach von dem zugesetzten Guanin 66 pCt. als Xanthin wiedergefunden worden, ca. 63 pCt. in Harnsäure umgesetzt.

Versuch VIII wurde nach 7 Stunden unterbrochen.

Wiedergefunden: 0,15 g Harnsäure,
Spuren Xanthin.

Die merkwürdigen Resultate der Versuche mit dem Gemisch von Milzextract und Nierenextract mit Guanin führten dazu, dass nunmehr der Einfluss des Nierenmilzgemisches auf zugesetzte Harnsäure direct studirt werden musste.

Versuchsreihe E.

175 ccm Nierenextract plus 0,3 g Harnsäure plus 175 ccm Milzextract.

Versuch IX wurde nach 2 Stunden unterbrochen.

Wiedergefunden: 0,16 g Harnsäure.

Demnach wurden 47 pCt. der Harnsäure zerstört.

Versuch X wurde nach 4 Stunden unterbrochen.

Wiedergefunden: 0,11 g Harnsäure.

Demnach wurden 67 pCt der Harnsäure zerstört.

Versuchsreihe F.

350 ccm Nierenextract plus 0,3 g Harnsäure plus 350 ccm Milzextract.

Versuch XI wurde nach 4 Stunden unterbrochen.

Wiedergefunden: 0,19 g Harnsäure.

Demnach wurden 37 pCt. der Harnsäure zerstört.

Versuchsreihe G.

350 ccm Nierenextract plus 0,3 g Harnsäure plus 350 ccm Milzextract.

Versuch XII wurde nach 4 Stunden unterbrochen.

Wiedergefunden: 0,21 g Harnsäure.

Demnach wurden 30 pCt. der Harnsäure zerstört.

Versuch XIII wurde nach 7 Stunden unterbrochen.
Wiedergefunden: 0,08 g Harnsäure.
Demnach wurden 73 pCt. der Harnsäure zerstört.

Nachdem auf diese Weise auch bei der mit Harnsäure direct vorgenommenen Versuchsanordnung eine starke Beeinflussung des Fermentorgangs festgestellt war, unternahmen wir zur weiteren Klärung Versuche, in denen einmal aufgekochter Nierenextract zu frischem Milzextract, das andere Mal zu aufgekochtem Milzextract frischer Nierenextract zugesetzt wurde. Es sollte dabei vor allem die Frage entschieden werden, ob es sich bei der Beeinflussung um eine Fermentwirkung oder aber um eine Einwirkung anderer in den Extracten vorhandener Substanzen, wie z. B. Salze etc., handelt.

Versuchsreihe H.

350 ccm aufgekochter Nierenextract plus 0,3 g Guanin plus 350 ccm frischer Nierenextract.
Versuch XIV wurde nach 4 Stunden unterbrochen.
Wiedergefunden: 0,4 g Harnsäure.
Es ist daraus klar, dass sämmtliches Guanin quantitativ in Harnsäure umgesetzt wurde.
350 ccm aufgekochter Milzextract plus 0,3 g Harnsäure plus 350 ccm frischer Nierenextract.
Versuch XV wurde nach 4 Stunden unterbrochen.
Wiedergefunden: Spuren Harnsäure.
Es war also alle beigegebene Harnsäure zerstört.
Der Nierenextract hat also genau so gut gearbeitet, wie in den Versuchen des ersten Theils und wie wenn keine Mischung vorgelegen hätte, indem er innerhalb 4 Stunden sämmtliche zugesetzte Harnsäure glatt zersetzte.
Zum Schluss haben wir noch eine Versuchsreihe angestellt, welche den Einfluss des Milzextracts auf die Harnsäure und den Einfluss des Nierenextracts auf Guanin darlegen soll.

Versuchsreihe I.

350 ccm Milzextract plus 0,3 g Harnsäure.
Versuch XVI wurde nach 4 Stunden unterbrochen.
Wiedergefunden: 0,32 g Harnsäure.
Folglich besitzt der Milzextract für sich keine harnsäurezerstörende Wirkung.
350 ccm Nierenextract plus 0,3 g Guanin.
Versuch XVII wurde nach 4 Stunden unterbrochen.
Wiedergefunden: 0,23 g salzsaures Guanin (= 0,165 g Guanin);
Spuren Xanthin.
Es wurden darnach 55 pCt. des Guanins wiedergefunden.

Analytischer Beleg der aus den verschiedenen Versuchen vereinigten Harnsäure- und Xanthinpräparaten:

1. Harnsäure: 0,155 g Substanz verbrauchten nach Kjeldahl 37,0 ccm $^1/_{10}$ Normal-Oxalsäure.

Verlangt: 33,33 pCt. N.

Gefunden: 33,42 pCt. N.

2. Xanthin: 0,1022 g Substanz verbrauchten 26,82 ccm $^1/_{10}$ Normal-Oxalsäure.

Verlangt: 36,84 pCt. N.

Gefunden: 36,73 pCt. N.

Es haben sich also in diesen Versuchen eigenartige Beeinflussungen gezeigt, indem einerseits der Milzextract die harnsäurezerstörende Eigenschaft des Nierenextracts äusserst intensiv hemmt und andrerseits der Nierenextract die harnsäurebildende Eigenschaft des Milzextracts merklich hintanhält. Es liegen hier wohl schwerlich Wirkungen eines proteolytischen Ferments vor; denn sowohl der Nierenextract, wie der Milzextract für sich enthalten ja bereits solche, und es müsste also, wenn man die Störung auf die Proteolyse zurückführen wollte, eine solche schon im einfachen ungemischten Versuche ebenso zu Tage treten. Uebrigens ist die Einwirkung des proteolytischen Ferments keineswegs eine sehr intensive, was uns auch ein Versuch zeigte, den wir speciell nach dieser Richtung hin unternahmen. Allerdings müsste zur endgültigen Entscheidung eine grössere Versuchsreihe herangezogen werden. Da aber die Resultate sehr gut zusammen stimmen, so wollen wir hier kurz über den Versuch berichten.

Versuchsreihe K.

350 ccm Nierenextract plus ca. 2 ccm 10 proc. Ammoniak plus 2 g Pankreatin (Rhenania), dessen gute Wirksamkeit durch besondere Versuche festgestellt war, wurden über Nacht mit Chloroform und Toluol in den Brutschrank gestellt. Dann wurde das Gemisch, wie üblich, filtrirt und mit 0,3 g Harnsäure angesetzt.

Versuch XVIII wurde nach 4 Stunden unterbrochen.

Wiedergefunden: 0,06 g Harnsäure.

Demnach wurden 80 pCt. der Harnsäure zerstört.

Zur Controlle, ob nicht bereits das Ammoniak irgend eine Schädigung hervorruft, wurde folgender Controllversuch angesetzt. 350 ccm Nierenextract plus ca. 2 ccm 10 proc. Ammoniak eine Nacht im Brutschrank dann filtrirt und, wie üblich, mit 0,3 g Harnsäure angesetzt.

Versuch XIX wurde nach 4 Stunden unterbrochen.

Wiedergefunden: 0,07 g Harnsäure.

Demnach wurden 73 pCt. der Harnsäure zerstört.

So wenig der hemmende Einfluss auf die Proteolyse in den Extracten zurückgeführt werden kann, so wenig können die kochbeständigen Bestandtheile der Extracte dafür verantwortlich gemacht werden; denn

n den Versuchen, in welchen je ein aufgekochter Extract mit einem unaufgekochten zusammengebracht wurde, verlief die Reaction genau in den Grenzen und mit der Schnelligkeit, wie wir sie von den Einzelversuchen er kennen. Trotz der Anwesenheit des aufgekochten Nierenextracts urde durch den Milzextract zugesetztes Guanin überall schnell und öllig quantitativ in Harnsäure umgesetzt, und ebenso zerstörte der ierenextract trotz der Anwesenheit von aufgekochtem Milzextract zugesetzte Harnsäure in normaler Weise. Es ist also klar, dass hier eine gegenseitige Beeinflussung fermentativer Kräfte vorliegt. Wir d geneigt, daran zu denken, dass das stark active uricolytische erment die Activität der bei der Harnsäurebildung wirkenden ermente abschwächt, und umgekehrt. Allerdings sind zur endültigen Entscheidung weitere Versuche nöthig.

Jedenfalls aber steht als wichtiges Resultat der Untersuchung fest, ss das Organ, welches beim Rinde die eklatanteste Harnäurebildung veranlasst, hemmend auf die Thätigkeit des rgans wirkt, welchem die intensiveste Harnsäurezerstörung ugehört.

Es dürfte diese Beobachtung Licht auf mancherlei Resultate werfen, elche bisher nicht so leicht zu erklären waren. So finden wir z. B. n der Leber, ebenso in der Niere selbst nebeneinander zweifellos die ermente der Harnsäurebildung und -Zerstörung vertreten. Das beweisen ie früheren Versuche Schittenhelm's und Burian's. Aber die Harnäurebildung und die Harnsäurezerstörung lässt sich mit diesen Organen n vitro keineswegs in der intensiven Weise erreichen, wie die einzelnen rocesse mit denjenigen überlebenden Organen erreicht werden können, elche scheinbar nur die eine oder die andere Umsetzungsfähigkeit beitzen.

Es dürfte eben auch da, sobald bei der Extraction der Fermente urch Wasser dieselben in hochwirksamen activen Zustand versetzt sind, ine gegenseitige Beeinflussung stattfinden.

Dass diese im normalen Organismus nicht bereits im Leben auftritt, ist sicherlich damit zu erklären, dass hier, wie überall, die Fermente in einem inactiven Zustand innerhalb der Zelle festgelegt sind und ur dann, wenn der Organismus sie braucht und in dem Maasse, als ie gebraucht werden, aus dem inactiven Zustand in den activen übereführt werden.

Stellen wir uns vor, dass unter gewissen pathologischen Verhältältnissen gewissermaassen eine Hypersecretion eines der Fermente statthat, so müsste dann ein ähnlicher Zustand schon im Leben innerhalb es Organs auftreten, wie er in vitro direct beobachtet werden kann, as heisst, es müsste dann zu einer Hemmung im fermentativen Ablauf es Harnsäurestoffwechsels kommen, welcher sowohl die Harnsäureildung, wie die Harnsäurezerstörung betreffen müsste.

Bekanntlich haben Brugsch und Schittenhelm (16) in einer Reihe on Abhandlungen die Gicht als Folge einer Hemmung des ganzen Purinstoffwechsels erklärt. Sie sind dazu gekommen durch den Vergleich des

normalen und pathologischen Nucleinstoffwechsels. Aus der Verfolgung des exogenen Purinstoffwechsels konnten sie schliessen, dass beim Gichtkranken eine verlangsamte Purinbasenumbildung i. e. verlangsamte Harnsäurebildung vorliegt. Diese Störung betrifft jedoch auch die endogene Harnsäure, welche in den meisten Fällen einen auffallend niedrigen Werth zeigt. Als zweite Etappe in der Stoffwechselstörung der Gicht stellen die beiden Autoren eine verminderte bezw. verlangsamte Harnsäurezerstörung fest, sodass also bei der Gicht die ganze Reihe der Fermentprocesse des Nucleinstoffwechsels in einem weniger intensiven Tempo arbeitet, wie normaler Weise.

Diese im Stoffwechselversuch gefundenen Ergebnisse werden nunmehr offensichtlich gestützt durch die Resultate der vorliegenden Versuchsreihen. Wird doch in diesen experimentell das erzeugt, was beim Gichtkranken pathologischerweise der Organismus besorgt. Die Vorstellung, dass hier eine Störung im ganzen Fermentapparat des Nucleinstoffwechsels statthat, gewinnt feste Gestalt, und es ist ein Weg gegeben, auf dem eine experimentell fundirte Erklärung für die eigenartige pathologische Störung erbracht werden kann.

Mithin geben unsere Versuche nicht nur einen interessanten Beitrag für die experimentelle Physiologie, sondern sie dienen auch dazu, in den wichtigen Fragen der pathologischen Physiologie Klarheit zu verschaffen.

Als Nebenbefund erwähnen wir noch, dass wiederum Uebereinstimmung mit früheren Versuchen festgelegt ist, dass beim Rind die Milz scheinbar keine harnsäurezerstörende Fähigkeiten besitzt. Wenn wir jedoch bedenken, dass selbst ein so intensiv harnzerstörendes Organ wie die Niere durch Beimengung von Milzextract so beträchtlich in ihrer Thätigkeit nach dieser Richtung gestört wird, dann ergiebt sich daraus die Nothwendigkeit, bei derartigen Befunden in vitro mit den Schlüssen auf das lebende Organ vorsichtig zu sein. Es ist wohl möglich, dass der Rindermilz neben der Harnsäurebildung im Leben auch eine Harnsäurezerstörung zukommt, diese Harnsäurezerstörung aber kann in vitro nicht beobachtet werden, weil die überaus activen harnsäurebildenden Fermente die Harnsäurezerstörung vollkommen lahm legen.

Aehnlich verhält es sich mit der Harnsäurebildung im Nierenextract. Dass hier eine solche zweifellos stattfindet, zeigten schon frühere Versuche von Schittenhelm, und auch der vorliegende Versuch darf wohl als Beweis dafür angenommen werden; denn von dem zugesetzten Guanin ist nur mehr ungefähr die Hälfte wiedergefunden worden, während die andere Hälfte zum kleineren Theil als Xanthin erhalten werden konnte zum Theil völlig in Verlust gerieth. Es muss angenommen werden, dass dieser verlorene Rest in dem Extract über das Xanthin zu Harnsäure umgesetzt wurde, und als solche der sofortigen Zerstörung anheimfiel, sodass für das lebende Organ zweifellos eine rege Harnsäurebildung neben der Harnsäurezerstörung angenommen werden dürfte. Genau so liegt es bei der Leber und ebenso wohl auch beim Muskelgewebe, nur dass vielleicht in einem Organ diese, im anderen jene Fermentgruppe da

Uebergewicht hat, während wieder andere einen gewissen Gleichgewichtszustand besitzen.

Daraus, dass die Harnsäurebildung und die Harnsäurezersetzung nicht in allen Organen gleich intensiv vor sich geht, erklärt es sich ferner, dass trotz der intensiven Harnsäurezerstörung gewisser Organe ständig geringe Mengen Harnsäure im Blute kreisen und mit dem Urin abgeschieden werden. Wenn die Harnsäurebildung und die Harnsäurezerstörung überall gleichen Schritt hielten, dann könnte es ja nicht zu einer Ausfuhr von Harnsäure durch die Niere kommen.

Wir können darum wohl sagen, dass unsere angeführten Feststellungen sehr geeignet sind, neues Licht auf manche, bis jetzt noch dunkle und schwer verständliche Vorgänge des Nucleinstoffwechsels zu werfen.

Litteraturverzeichniss.

1) Burian, R., Die Herkunft der endogenen Harnpurine bei Mensch und Säugethier. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 1904/05. Bd. 43. S. 532.
2) Wiener, H., Ueber Zersetzung und Bildung von Harnsäure im Thierkörper. Arch. f. experiment. Path. u. Pharmak. 1899. Bd. 42. S. 373.
3) Burian, R., Ueber die oxydative und die vermeintliche synthetische Bildung von Harnsäure in Rinderleberauszug. Zeitschr. f. physiolog. Chemie. 1904/05. Bd. 43. S. 497.
4) Fischer, E., Untersuchungen in der Puringruppe (1882—1906). Berlin. Verlag von J. Springer. 1907.
5) Kossel, A., Ueber das Nuclein der Hefe. Zeitschr. f. physiolog. Chemie. 1879. Bd. 3. S. 284. — Derselbe, Ebendas. 1880. Bd. 4. S. 390. — Derselbe, Ueber die Herkunft des Hypoxanthins. Ebendas. 1881. Bd. 5. S. 152. — Derselbe, Ueber die Verbreitung des Hypoxanthins im Thier- und Pflanzenreich. Ebendas. 1881. Bd. 5. S. 267. — Derselbe, Zur Chemie des Zellkerns. Ebendas. 1883. Bd. 7. S. 7. — Derselbe, Weitere Beiträge zur Chemie des Zellkerns. Ebendas. 1886. Bd. 10. S. 248. — Derselbe, Ueber Nucleine. Verhandlung des Congresses f. innere Med. 1896. S. 183.
6) Schittenhelm, A., Ueber die Harnsäurebildung in Gewebsauszügen. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 1904. Bd. 42. S. 251. — Derselbe, Ueber die Fermente des Nucleinstoffwechsels. Ebendas. Bd. 43. S. 229. — Derselbe, Ueber die Harnsäurebildung und Harnsäurezersetzung in den Auszügen der Rinderorgane. Ebendas. 1905. Bd. 45. S. 121. — Derselbe, Ueber das uricolytische Ferment. Ebendas. 1905. Bd. 45. S. 161. — Derselbe, Der Nucleinstoffwechsel und seine Fermente bei Mensch und Thier. Ebendas. 1905. Bd. 46. S. 354.
7) Horbaczewski, Untersuchungen über die Entstehung der Harnsäure im Säugethierorganismus. Monatshefte für Chemie. 1889. Bd. 10. S. 624.
8) Spitzer, W., Die Ueberführung von Nucleinbasen in Harnsäure durch die sauerstoffübertragende Wirkung von Gewebsauszügen. Archiv f. Physiol. 1899. Bd. 76. S. 192.
9) Cohnheim, O., Die Physiologie der Verdauung und Ernährung. Verlag von Urban und Schwarzenberg. Berlin-Wien.
10) Schittenhelm, A., Ueber die Fermente des Nucleinstoffwechsels. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 1908. Bd. 56.
11) Schittenhelm, Zur Frage der Uricolyse. Centralbl. für die gesammte Physiol. und Patholog. des Stoffwechsels. 1907. Bd. 2. S. 561.
12) Stockvis, Bijdragen tot de Physiol. van het acidum uricum. 1859. Nederl. Tijdschrift voor Geneeskunde. — Derselbe, Donders' Archiv f. d. holländ. Beiträge. Utrecht. 1860. Bd. 2. S. 268.
13) Brunton, Centralbl. f. Physiol. Bd. 19. No. 1. S. 5. — Derselbe, Arch. scienc. St. Petersburg 1904. (Pawlow's Festschrift.)
14) Ascoli, Ueber die Stellung der Leber im Nucleinstoffwechsel. Pflüger's Archiv. Bd. 72. S. 340.
15) Wiechowski und Wiener, Ueber Eigenschaften und Darstellung des harnsäurezerstörenden Fermentes. Hofmeister's Beiträge. 1907. Bd. X.
16) Brugsch, Th. und Schittenhelm, A., Zur Stoffwechselpathologie der Gicht. Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Ther. 1907. Bd. 4. Mitth. 1—6 u. Bd. 6, Mitth. 7.

Lebenslauf.

Ich, Bruno Horst Werner Künzel, wurde am 26. August 1883 zu Leipzig als Sohn des Kaufmanns Gustav Künzel und seiner Frau Sophie geb. Hartmann geboren. Daselbst besuchte ich von Ostern 1893 bis Ostern 1902 das König Albert-Gymnasium, und bestand Ostern 1902 das Abiturientenexamen. Darauf widmete ich mich an den Universitäten Jena, Leipzig und Würzburg dem Studium der Medicin, an welch' letzterer ich im Mai 1906 die ärztliche Vorprüfung bestand. Sodann besuchte ich die Universitäten Leipzig und Erlangen. An letzterer beendete ich am 4. Juni 1908 die ärztliche Prüfung. Zur Zeit bin ich zur Ableistung des practischen Jahres an der medicinischen Klinik der Universität Erlangen thätig.